

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Ruang lingkup penelitian

Ruang lingkup penelitian ini tercakup dalam bidang kesehatan gigi dan mulut.

4.2. Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan di kota Jogjakarta karena angka prevalensi pertama kali merokok pada usia 5-9 tahun di kota tersebut merupakan urutan ke-2 terbesar dari seluruh provinsi di Indonesia. Prevalensi mulai merokok setiap hari pada umur 25-29 tahun tetap menunjukkan angka ke-2 tertinggi dan pada umur lebih dari atau sama dengan 30 tahun malah menduduki peringkat teratas dengan angka 9,3 %. Ini menunjukkan rentang waktu kebiasaan merokok di Jogjakarta cukup panjang dan terus mengalami peningkatan hingga pada usia lebih dari 30 tahun dimana provinsi lain di Indonesia mengalami penurunan.⁷

Waktu penelitian 30 hari kerja.

4.3. Desain penelitian

Desain penelitian adalah *cross-sectional*

4.4. Variabel penelitian

4.4.1. Variabel bebas

Paparan asap rokok

4.4.2. Variabel tergantung

Frekuensi mikronukleus mukosa mulut

4.4.3. Variabel perancu

- a. Usia : 20-40 tahun
- b. Jenis rokok : Rokok Kretek
- c. Lama merokok : minimal 3 tahun
- d. Frekuensi merokok : minimal 5 batang per hari
- e. Status kebersihan mulut menggunakan kriteria *Simplified Oral Hygiene Index* (OHI-S) : cukup

4.5. Populasi dan sampel

4.5.1. Populasi target

Laki-laki dewasa (usia 20 – 40 tahun).

4.5.2. Populasi terjangkau

Populasi laki-laki di Kota Jogjakarta yang berusia 20-40 tahun

4.5.3. Sampel penelitian

Laki-laki dewasa usia 20-40 tahun di Jogjakarta yang memenuhi kriteria inklusi.

4.5.4 Kriteria inklusi

Sampel

- a. Laki-laki dewasa berumur 20-40 tahun.
- b. Nilai OHI-S cukup.
- c. Bersedia mengikuti penelitian, dibuktikan dengan *informed consent*
- d. Memiliki Indeks Massa Tubuh ideal
- e. Merokok kretek lebih dari 5 batang per hari selama lebih dari 3 tahun

Kontrol

- a. Laki-laki dewasa berumur 20-40 tahun.
- b. Nilai OHI-S cukup.
- c. Bersedia mengikuti penelitian, dibuktikan dengan *informed consent*
- d. Indeks Massa Tubuh masuk dalam kategori ideal
- e. Tidak pernah merokok seumur hidupnya

4.5.5 Perkiraan jumlah sampel

Perhitungan besar sampel untuk uji hipotesis terhadap rerata 2 populasi independen perokok dan tanpa perokok dihitung dengan rumus :

$$n_1=n_2= 2 \left(\frac{(Z\alpha+Z\beta)s^2}{x_1-x_2} \right)$$

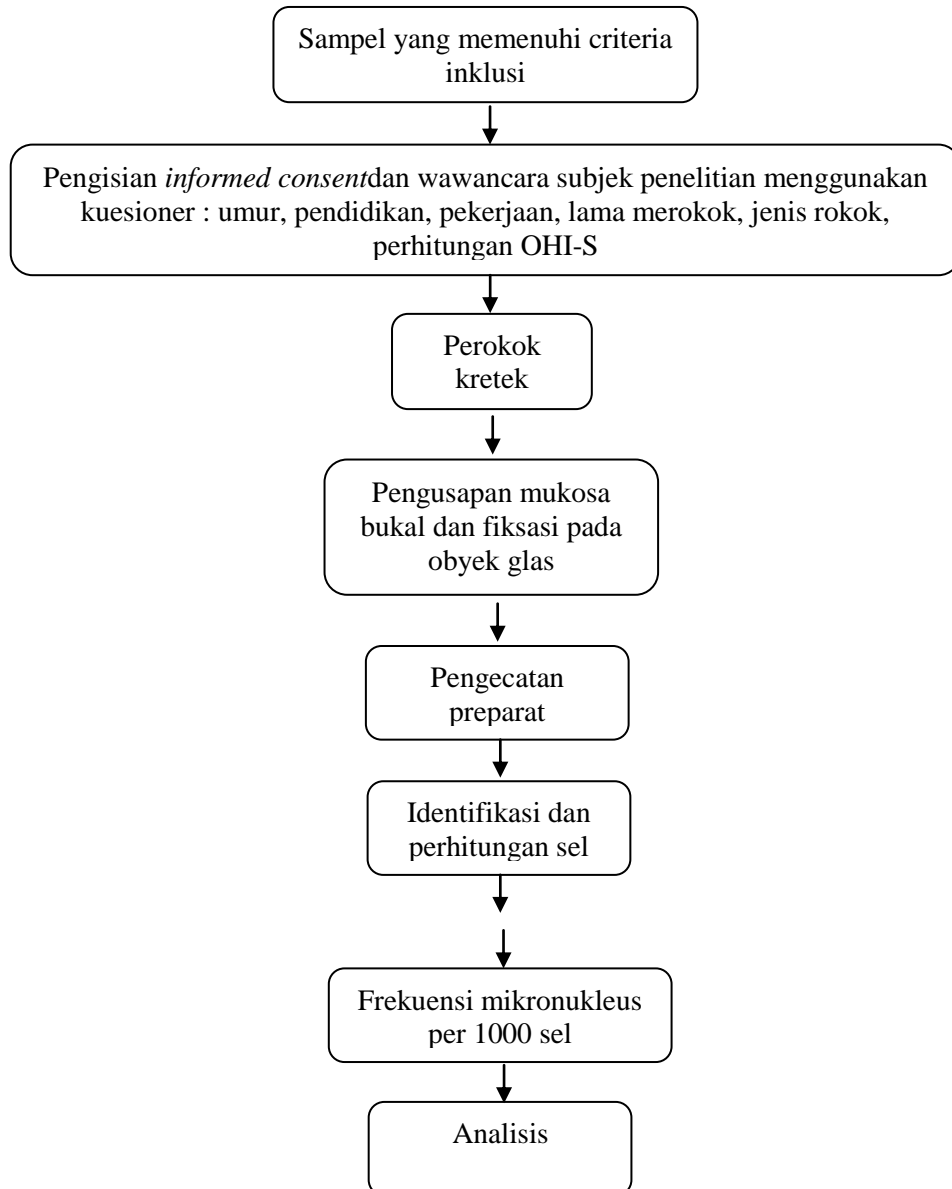
Keterangan :

- a. $Z\alpha$ = Standart deviasi pada tingkat kesalahan 0,05 (1,96)
- b. $Z\beta$ = Power ditetapkan oleh peneliti sebesar 95 % (0,842)
- c. s = 2,05
- d. x_1-x_2 = 1,5

besar sampel minimal didapatkan 29 orang.

Sampel penelitian ini adalah 35 orang perokok yang memenuhi kriteria inklusi dan kontrol 35 orang yang bukan perokok dan tidak terpapar asap rokok.

4.6 Alur Penelitian



4.7 Definisi operasional variable

No	Variabel	Satuan	Skala
1	Usia	tahun	Rasio
2	Kelompok	1 : perokok 2 : bukan perokok	Nominal
3	Lama merokok	tahun	Rasio
4	Frekuensi Merokok	Batang/hari	Rasio
5	Mikronukleus	Per 1000 sel	Rasio

- Variabel usia dibatasi pada rentang usia 20-40 tahun
- Lama merokok lama menunjukkan berapa lama seseorang sudah secara rutin terpapar asap rokok secara aktif dalam satuan tahun
- Variabel Frekuensi merokok merupakan banyaknya rokok yang dikonsumsi selama satu hari dengan satuan batang/hari
- Variabel mikronukleus menunjukkan banyaknya mikronukleus yang ditemukan dalam preparat hapusan sel bukal yang dilihat tiap 1000 sel

4.8 Cara kerja penelitian

a. Pengisian *informed consent* dan pengisian kuesioner.

1. Subyek penelitian yang memenuhi kriteria inklusi, diberikan penjelasan lengkap secara lisan, apabila menyatakan kesediaan untuk menjadi subyek penelitian, dimohon mengisi formulir *informed consent*.

2. Anamnesis mengenai data dasar meliputi : usia, lama merokok, jenis rokok, frekuensi merokok sesuai yang tercantum dalam kuesioner.
3. Menghitung indeks kebersihan mulut (OHI-s)

b. Pengambilan sel epitel mukosa mulut

1. Subyek diminta untuk berkumur, untuk menghilangkan debris di rongga mulut. dengan air putih satu gelas 250cc.
2. Dilakukan pengambilan sediaan, menggunakan sikat sel (*cytobrush*) dengan metode *smear*, dengan cara memutar sikat sel sekurang-kurangnya 360°.
3. Sikat sel diusapkan pada gelas obyek agar, dengan cara memutar sikat sel berlawanan dengan arah putaran pengusapan yang dilakukan pada mukosa.
4. Gelas obyek mengandung sel, diberi dua tetes NaCL 0,09% dan dibiarkan sampai kering.
5. Dilakukan fiksasi dengan merendam gelas obyek tersebut dalam larutan metanol-asetat.

c. Pengecatan preparat

1. Pengecatan dilakukan dengan metode modifikasi reaksi Feulgen-Rossenback.
2. Spesimen direndam dalam larutan 5M HCl pada suhu ruang selama 15 menit lalu dicuci dengan aquades selama 10-15 menit.

3. Selanjutnya spesimen diwarnai dengan reagen Schiff selama 90 menit dilanjutkan dengan pewarnaan Fast Green 1% selama 1 menit.

d. Interpretasi sel dan penghitungan sel

1. Spesimen kemudian diidentifikasi dengan menggunakan mikroskop cahaya (400x).
2. Satu preparat setidaknya didapat hasil swab sejumlah 1000 sel setiap individu.
3. Sebelum menginterpretasi mikronukleus, sel yang dimasukkan dalam kriteria perhitungan harus memiliki parameter tertentu untuk bisa dilakukan skoring.
4. Parameter yang harus terpenuhi yaitu :
 - a. Sitoplasma sel masih utuh dan posisi sel dalam preparat relatif datar.
 - b. Sel yang diamati sedikit atau tidak bertumpukan dengan sel disebelahnya
 - c. Nukleus normal dan utuh, perimeter nuklear halus, dan berbatas jelas
 - d. Preparat mengandung sedikit atau tidak ada debris sama sekali
5. Kriteria yang digunakan untuk mengidentifikasi mikronukleus pada sel antara lain :
 - a. Perimeter nukleus bulat dan halus
 - b. Ukuran kurang dari sepertiga diameter nukleus tetapi cukup besar untuk bisa dilihat baik bentuk maupun warnanya.

- c. Pewarnaan Feulgen positif (nukleus berwarna merah muda dengan sedikit iluminasi)
 - d. Intensitas warna dan teksturnya mirip dengan nukleus
 - e. Inti sel tidak bertumpukan dan seolah memiliki jembatan dengan nukleus
6. Mikronukleus yang teridentifikasi dan sesuai kriteria diatas dihitung dengan menggunakan *handy counter*. Frekuensi mikronukleus ditulis dalam satuan per 1000 sel yang dihitung.
 7. Anomali nukleus yang lain selain mikronukleus seperti nukleus piknotik, karyolisis, karyoreksis, *nuclear bud (broken eggs)*, dan binucleated tidak dihitung.

e. Alat dan bahan penelitian.

1. Alat dan bahan untuk pengambilan spesimen sel epitel bukal subyek

1. Sikat sel
2. Air

2. Alat dan bahan untuk pembuatan preparat dan pengecatan

1. Gelas obyek
2. NaCl 0,09%
3. Metanol-asam asetat (3:1)
4. 5M HCl
5. Aquades
6. Reagen Schiff's

7. *Counterstained* Fast Green 1%

8. *Glass cover slip*

3. Alat dan bahan untuk penghitungan sel

1. Mikroskop cahaya (400x)

2. *Handy counter*

4.9 Pengolahan dan Analisis Data

Sebelum dilakukan analisis data, maka data yang diperoleh dari masing-masing responden dalam formulir pencatatan dilakukan :

a. Penyuntingan :

Bertujuan untuk mengoreksi data, kebenaran dan kelengkapan pencatatan.

Penyuntingan dilakukan di tempat pengumpulan data agar apabila terjadi kesalahan atau kekurangan dapat segera dilakukan perbaikan.

b. Tabulasi dan pengelompokan data.

Data yang terkumpul dipindahkan ke dalam tabel dan dikelompokkan sesuai variabel penelitian.

c. Analisis Data

Analisa data dilakukan dengan membandingkan jumlah mikronukleus pada kelompok terpapar dan kelompok kontrol. Normalitas sebaran data digunakan uji *Shaphiro-Wilk*. Bila distribusi data normal, dilakukan analisis statistik parametric dengan uji T independen. Sedangkan bila distribusi data tidak normal dilakukan uji non parametrik *Mann-whitney*.

Uji korelasi dan regresi dilakukan pada kelompok terpapar. Uji tersebut dilakukan untuk mengetahui hubungan antara frekuensi merokok, lama merokok, dan usia terhadap pembentukan mikronukleus pada kelompok tersebut. Batas kemaknaan atau signifikansi ditentukan $p \leq 0,05$ dengan interval kepercayaan 95%.

4.10 Etika Penelitian

Ijin penelitian diajukan kepada Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang. Setiap subyek penelitian yang dilakukan pemeriksaan dan menjadi sampel pada penelitian ini dimintakan persetujuan secara tertulis dan mengisi *informed consent* secara tertulis.

Kepentingan subyek penelitian diutamakan dan tidak ditarik biaya.

4.11 Jadwal Penelitian

Kegiatan	Bulan Pelaksanaan
Penyusunan proposal	Desember - Januari 2012
Ujian proposal	Februari 2013
Pengambilan sampel	Maret – April 2013
Pengolahan dan analisis data	Mei – Juni 2013
Penyusunan Karya Tulis Ilmiah	Juni – Juli 2013
Ujian hasil	Agustus 2013

Tabel 3. Jadwal Penyusunan Karya Tulis Ilmiah